Experimentelle Untersuchungen

über den Antagonismus zwischen dem Bacterium fluorescens und der Typhaceen-Gruppe.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER

MEDIZINISCHEN DOKTORWÜRDE

DER

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER

ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT

ZU

FREIBURG IM BREISGAU

ACAD.
LUDOVIC.
BIBL.

VORGELEGT VON

ALFRED WELZ
MEDIZINALPRAKTIKANT
AUS
LAUBAN IN SCHLESIEN.

Freiburg i. Br.
SPEYER & KAERNER
Universitätsbuchhandlung
1909.

Gedruckt mit Genehmigung der med. Fakultät zu Freiburg i./Br.

Dekan:
Professor Dr. de la Camp.

Referent:
Geh. Hofrat Professor Dr. Schottelius.

Druck von A. Bonz' Erben in Stuttgart.

Meinen lieben Eltern!

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543126_0051

Einleitung.

Neben den glänzenden Erfolgen, die der Bakteriologie dank ihrer Isolierungsmethoden in dem Studium der Bakterien-Reinkulturen beschieden waren, hat man lange Zeit den interessanten Wechselbeziehungen der Mikroorganismen zu einander weniger Beachtung geschenkt.

Man sah zwar täglich bei den Arbeiten im Laboratorium, wie auf den besten Nährsubstraten unter den günstigsten Lebensbedingungen der anfangs schier ins Ungemessene fortschreitenden Vermehrung der Individuen[1]) sehr bald eine ganz bedeutende Wachstumshemmung, ja schliesslich ein massenhaftes Zugrundegehen folgt[2]), man wusste auch wohl, dass das eigene Stoffwechselprodukt der Bakterien lebenshindernd für die eigene Art werden kann; doch erst seit Garrès Mitteilungen anlässlich einer Versammlung des Schweizer ärztlichen Zentralvereins in Basel im Jahre 1887 ist bekannt, dass derartige Ausscheidungsstoffe, die sich

---

[1]) Nach M. Müller, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 20, S. 245, entsteht eine neue Generation von Typhusbakterien bei 37° zirka nach ½ Std.

[2]) Gottschlich und Weigang, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 20, S. 376, finden, dass z. B. eine schräge Agarkultur von Choleravibrionen nach 44 Std. nur noch etwa 12 %, nach 68 Std. nur noch etwa 3 % derjenigen Vibrionenmenge lebend beherbergt, die nach 20 Std. lebend vorhanden war.

in der Umgebung der Bakterienkultur anhäufen, „nicht nur für die eigenen Produzenten zum Entwicklungshindernis werden, sondern auch bestimmte andere Arten in auffallender Weise mehr oder weniger dadurch beeinflusst werden.“ [1]) Mit anderen Worten: die wachstumshemmenden Stoffwechselprodukte, deren Bildung allen Bakterien-Stämmen eigentümlich ist, zeigen gegenüber anderen Stämmen in ausgesprochener Weise ein elektives Verhalten. Das ist von ausserordentlicher Bedeutung für die Wechselbeziehungen in der Bakterienwelt; hier liegt das Fundament für das Verständnis von Symbiose und Antagonismus; von hier aus, darf man hoffen, wird man später, zugleich mit der exakteren Analyse dieser hochkompliziert gebauten, labilen Substanzen einen noch besseren Einblick gewinnen in den Kampf ums Dasein, der sich fortgesetzt im Leben der Mikroorganismen abspielt.

Mehr als die Vorgänge bei der Symbiose — es sei hier nur an das von de Bary zuerst beobachtete Zusammenleben von bestimmten Hefezellen mit Dispora caucasica bei der Kefirbildung erinnert — war es das Phänomen des **Antagonismus der Bakterien**, das einer genaueren Erforschung wert schien, wohl zunächst wegen der spekulativen Perspektive, die sich hinsichtlich einer wirksamen ätiologischen Therapie der Infektionskrankheiten damit zu eröffnen schien.

In der Tat kann man sich wohl im Kampfe gegen die Bakterien, „die sich vor unseren groben Waffen im Körper so gut zu bergen wissen“, keine wirksameren Streiter denken, als eben wieder Bakterien. Doch die Erwartungen nach dieser Richtung hin haben sich nicht erfüllt, eine rationelle „Bakteriotherapie“, die über den

---

[1]) C. Garrè, Über Antagonisten unter den Bakterien, Korrespondenzblatt für Schweizer Ärzte, Jahrg. 17.

Rahmen der in den verschiedenen Schutzimpfungen bekannten Prophylaxe hinausginge, hat sich nicht ausbilden können; man scheut sich mit Recht, eine bestehende Infektionskrankheit durch Aufimpfen eines neuen Virus zu komplizieren; weiss man doch, dass Mischinfektionen im Organismus nicht selten ganz besonders schwere Erkrankungsformen hervorrufen.

Aber der Antagonismus der Bakterien hat im Haushalte der Natur doch unter gewissen Verhältnissen, nämlich dann, wenn es sich um pathogene Bakterien ausserhalb des menschlichen Körpers handelt, eine nicht geringe hygienische Bedeutung. Bekannt ist die Nutzanwendung, die man hiervon für die Choleraerreger gemacht hat, wenn sie, wie in Abortgruben, mit überwältigenden Mengen von Fäulnisbakterien zusammenkommen: die Saprophyten überheben uns zu Cholerazeiten der Mühe, die Gruben zu desinfizieren.

Sollten nicht auch die im Wasser lebenden Bakterien die Fähigkeit haben, ihrerseits pathogene Keime, die zufällig ins Wasser gelangt sind, zu vernichten? Die Entscheidung dieser Frage, soweit es sich um den Einfluss eines unserer häufigsten Wasserbewohner, des Bacterium fluorescens liquefaciens auf den Erreger des Typhus abdominalis handelt, ist schon von verschiedenen Seiten versucht worden, mit dem Ergebnis, dass Garrè [1]) eine gegenseitige Wachstumshemmung beider Arten konstatiert, Lewek [2]) dagegen keinerlei Beziehungen zwischen ihnen finden kann, während Olitzky [3]) von einem ein-

---

[1]) Garrè, l. c.

[2]) Lewek, Über den Wachstumseinfluss einiger nicht pathogener Spaltpilze auf pathogene. Inaug.-Dissertat. Freiburg i. Brg. 1889 und Zieglers Beiträge f. path. Anat. Bd. VI, 1889, S. 277.

[3]) Olitzky, Über die antagonistischen Wirkungen des Bacillus fluorescens liquefaciens und seine hygienische Bedeutung. Inaug.-Dissertat. Bern 1891. Referat Zentralbl. für Bakteriol. I, Bd. 13, S. 734.

seitigen Antagonismus des Fluorescens auf die Entwickelung des Typhusbakteriums berichtet.

Angesichts dieser Divergenz der Resultate veranlasste mich Herr Geheime Hofrat Professor Schottelius, die Frage nochmals aufzunehmen, sie experimentell zu entscheiden und die Untersuchungen zugleich auf einige andere Stämme der Typhus-Coli-Gruppe auszudehnen.

Methoden zum Nachweis des Bakterien-Antagonismus.

So auffällig scheinbar die Tatsache ist, dass verschiedene Beobachter zu so abweichenden Anschauungen über den Bakterienantagonismus gekommen sind, so erklärt sie sich doch leicht, wenn man berücksichtigt, dass 1. je nach Alter, Herkunft und Virulenz der verwendeten Arten und 2. je nach der Methode der Versuchsanordnung das Resultat wechseln kann. Darum habe ich meine eigenen Experimente nur mit solchen frisch gewonnenen Bakterienkulturen angestellt, deren Lebensweise, noch nicht durch vielfache Übertragungen alteriert, möglichst der natürlichen gleichkommt. Und weiterhin ist die Art der Versuchsanordnung so verschieden gestaltet worden, dass man schliesslich berechtigt ist, von diesem Faktor bei der Einschätzung des Resultates ganz zu abstrahieren.

Nun steht fest, dass in Bezug ihrer Ansprüche an die qualitative Zusammensetzung der Nährsubstrate und Temperatur, ferner in Bezug auf Feuchtigkeitsgehalt der Umgebung und Sauerstoffbedarf die einzelnen Bakterienarten den verschiedensten Existenzbedingungen unterworfen sind.

Ferner ist aus Behrings [1]) Untersuchungen bezüglich der entwickelungshemmenden Wirkung chemischer Agentien bekannt, dass bei dem Temperaturoptimum

[1]) Behring, Über Desinfektion, Desinfektionsmittel und Desinfektionsmethoden, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 9, S. 395.

wachstumschädigende Faktoren von den Bakterien leichter überwunden werden. Somit wird also auch nach Möglichkeit für eine Variation der Lebensbedingungen zu sorgen sein, um dadurch vielleicht der einen der beiden Arten eine besonders günstige Gelegenheit zur Entwickelung zu geben, sie vor der anderen zu bevorzugen und sie damit unter Umständen noch zum Wachstum zu veranlassen, wenn sie vorher unter für sie weniger günstigen Bedingungen versagt hatte.

Es ist interessant zu sehen, wie die verschiedenen Autoren den technischen Schwierigkeiten bei solchen Experimenten zu begegnen suchten. Von den in der Literatur über den Bakterienantagonismus niedergelegten Methoden kommen im wesentlichen vier voneinander gänzlich abweichende Arten der Versuchsanordnung in Betracht, die ich hier gleich in ihren Verschiedenheiten charakterisieren will:

I. Reihe: Die Bakterien werden nebeneinander auf feste Nährböden geimpft (in Form von Strichen, Punkten, sich kreuzenden Linien).

II. Reihe: Die Bakterien werden neben- oder nacheinander in Bouillon, oder bei Bruttemperatur gehaltene (flüssige) Gelatine gebracht.

III. Reihe: Ein Nährboden, der physikalisch abgetötete Bakterien der einen Art enthält, wird mit der zweiten Art beschickt.

IV. Reihe: Die Bakterien der einen Art werden in das keimfreie Filtrat oder Dialysat der anderen Art gebracht.

I.

Die einfachsten Experimente über die Wechselbeziehungen der Bakterien bestehen in dem Zusammenbringen verschiedener Arten auf den gleichen festen Nährböden. Sie erfolgen in Anlehnung an die chronologisch frühesten Mitteilungen, die über den

Bakterienantagonismus überhaupt gemacht worden sind; sie sind einer exakten makroskopischen Beurteilung und Deutung relativ leicht zugänglich und ergeben dabei sehr instruktive Resultate. Ein nicht unwesentlicher Nachteil aber besteht darin, dass die hier als Substrat verwendeten ausschliesslich kolloiden Substanzen mit ihrem trägen Diffusionsvermögen an und für sich wenig geeignet erscheinen, eine gleichmässige, den natürlichen Verhältnissen nahekommende Einwirkung der hemmenden Stoffwechselprodukte zu gewährleisten.

Einer solchen Versuchsanordnung bedient sich z. B Garrè, auf dessen Untersuchungen[1]) gewöhnlich die Lehre von dem Antagonismus der Bakterien zurückgeführt wird, weil er zuerst die in Frage stehenden Erscheinungen unter diesem Namen beschrieb und gerade durch diese Bezeichnung bekannt machte. Doch war schon vor Garrè von Pasteur ein Antagonismus des Erregers der Hühnercholera gegenüber Milzbrandbazillen beobachtet worden, und auch Soyka hatte schon im Jahre 1885 auf der Naturforscherversammlung in Strassburg[2]) über die Entwickelung von pathogenen Spaltpilzen unter dem wechselseitigen Einfluss ihrer Zersetzungsprodukte kurz berichtet.

Garrè impft auf die „brach erkaltete“ Platte von Fleischpeptongelatine gleichzeitig in parallelen Strichen alternierend die zu untersuchenden Arten, und zwar so, dass jeweils die Distanz der Impfstriche grösser wird, von 3—15 mm. Die Ausscheidungsprodukte der etwas rascher wachsenden Art diffundieren in die Umgebung und werden bei vorhandenem Antagonismus für die näher gelegenen Impfstriche der anderen Art zum absoluten Entwickelungshindernis; je weiter entfernt sie aber liegen, um so eher kann die Entwickelung einsetzen und zu

[1]) Garrè, l. c.

[2]) Tageblatt der 58. Versammlung deutscher Naturforscher und Ärzte in Strassburg 1885.

einer gewissen Höhe gelangen, bis das Gift der Antagonisten ihnen Halt gebietet.

Olitzky[1]) modifiziert die von Garrè angegebene Methode in der Weise, dass die Impfstriche einander rechtwinkelig schneidend angelegt werden.

In dem Bestreben, die möglich nahe zusammengebrachten Bakterien unter ganz gleiche Bedingungen zu stellen und die wechselseitigen Einflüsse der Kulturen gleichmässig von allen Seiten einwirken zu lassen, hat Lewek[2]) eine Anordnung getroffen, je 2 Arten in alternierenden Punkten schachbrettartig auf Platten wachsen zu lassen. Er zeichnet sich zu diesem Zwecke auf weisses Kartonpapier quadratische Felder nebeneinander, die dann schachbrettartig koloriert werden, so dass die Hälfte der Felder dunkel, die Hälfte hell bleibt. Schiebt man nun ein derartiges Kartonblatt unter eine mit Gelatine oder Agar beschickte Platte, so scheinen die schwarzen und weissen Felder von unten durch, so dass es ein Leichtes ist, zwei Bakterienarten in bestimmten Entfernungen voneinander zur Entwickelung zu bringen, wenn man sie mittels einer hakenförmig gebogenen Platinnadel von einer Bouillonkultur alternierend in die Mitte der Felder impft. Die Wachstumsverzögerung, welche gegenüber gleichzeitig angelegten Kontrollkulturen beobachtet wird, gibt den Grad des Antagonismus beider Arten an.

Kitasato[3]) legt grossen Wert darauf, die auf ihren Antagonismus zu prüfenden Spaltpilze in der mannigfachsten Weise aufeinander einwirken zu lassen; so impft er z. B. beide Arten gleichzeitig in Gelatine oder Agar oder er lässt erst den einen Organismus sich

---

[1]) Olitzky, l. c.

[2]) Lewek, l. c.

[3]) Kitasato, Über das Verhalten der Cholerabakterien zu anderen pathogenen und nichtpathogenen Mikroorganismen in künstlichen Nährsubstraten, Zeitschr. f. Hyg. VI, p. 1.

entwickeln und setzt dann erst den zweiten hinzu. Nach einigen Tagen werden die gemischten Kulturen auf andere Nährböden, z. B. sauren Agar oder Kartoffeln usw. übertragen und bei verschiedener Temperatur gehalten.

II.

Um die Unzulänglichkeiten auszuschalten, die sich bei der Verwendung fester, kolloidaler Nährsubstrate, wie Agar und Gelatine, wegen ihrer stark ausgeprägten Adsorptionserscheinungen ergeben, liegt der Gedanke nahe, ein Kulturmedium zu wählen, das im Gegensatz zu den Kolloidkörpern ein günstiges Lösungsmittel ist, nämlich die Nährbouillon. Indessen ist Eijkman[1]), der sich mehrfach mit der natürlichen Wachstumshemmung der Bakterien beschäftigte, in seinen Versuchen zu der Ansicht gekommen, dass die Bildung von Hemmungsstoffen in Bouillonkulturen bisher noch nicht hat nachgewiesen werden können, ohne dass er sie damit aber gänzlich in Abrede stellen will. Er stützt seine Anschauung auf die wiederholt von ihm gemachte Beobachtung, dass sich die klar abgehobene Flüssigkeit der zentrifugierten Bouillonkultur beim Aufenthalt im Brutofen immer wiederum trübt, gleichviel, welchen Alters das Ausgangsmaterial ist. Auch bei einer klar zentrifugierten Bouillonkultur, die durch Verdunstung

[1]) Eijkman, Über thermolabile Stoffwechselprodukte als Ursache der natürlichen Wachstumshemmung der Mikroorganismen. Zentralbl. f. Bakteriol. I Orig. Bd. 37, S. 436.
— Über natürliche Wachstumshemmung der Bakterien (zweite Mitteilung). Zentralbl. f. Bakteriol. I Orig. Bd. 41, S. 367 und 471.
— Über die Ursache der Wachstumshemmung in Bakterienkulturen. Berl. klin. Woch. 1906, S. 499.
— Über die Ursache der Wachstumshemmung in Bakterienkulturen. Deutsch. med. Woch. 1907, S. 265.

bei 40° C bis auf etwa das Viertel des ursprünglichen Volumens zwecks Konzentration der hypothetischen Hemmungsstoffe eingeengt wird, bleibt die nachträgliche Trübung nicht aus. Mit dieser Beobachtung stimmt bis zu gewissem Grade eine Mitteilung von Hehewerth[1]) überein, der für Coli bei 37° C angibt, dass, während die Agarkultur schon nach 18—24 Std. zu wachsen aufhört, in einer Bouillonkultur sogar noch nach 11 bis 14 Tagen Vermehrung stattfindet, ungeachtet, dass schon nach kurzer Zeit ein massenhaftes Absterben zu konstatieren ist.

Versuche mit lebenden Kulturen zweier Arten hat Kempner[2]) angestellt und durch möglichst genaue Zählung der Keime in Bouillon mit Hilfe des Wolffhügelschen Zählapparates die wechselseitigen Beziehungen beider Arten studiert. Wie er kommt auch Rehsteiner[3]), der nach einer besonderen Zählmethode quantitativ arbeitet, mit seinen Cholerabazillen nur zu negativen Resultaten.

Zur Erklärung dieser Tatsachen scheint es mir nicht unbegründet zu sein, wenn man den in flüssigen Medien kultivierten Bakterien neben ihrer Bewegungsfreiheit ein gewisses Elektionsvermögen gegenüber ihrer Umgebung zuerkennt. Wissen wir doch aus der Physiologie über die Art und Weise, wie der Austausch der Stoffe zustandekommt, dass die lebende Zelle ein Auswahlvermögen zeigt, so dass nicht alle in dem umgebenden Medium gelösten Stoffe in den Zellenleib

[1]) Hehewerth, Die mikroskopische Zählungsmethode der Bakterien von Alex Klein und einige Anwendungen derselben. Arch. f. Hyg. Bd. 39, S. 321.

[2]) Kempner, Über den vermeintlichen Antagonismus zwischen dem Choleravibrio und dem Bacterium coli commune. Zentralbl. f. Bakteriol. I. Bd. 17, S. 32.

[3]) Rehsteiner, Über den Einfluss der Wasserbakterien auf den Cholerabacillus bei der Gelatineplattenkultur. Arch. f. Hyg. Bd. 18, S. 395.

hineindiffundieren können, sondern nur bestimmte Stoffe aufgenommen, andere dagegen ausgeschlossen werden [1]). Die Zelle verhält sich unter gewissen Bedingungen so, als sei sie von einer semipermeablen Membran umgeben. Mit dem Tode der Zellen erlischt das Auswahlvermögen, und der Austausch zwischen dem toten Zellenleib und der umgebenden Flüssigkeit geht dann nach den allgemeinen Gesetzen der Diffusion vor sich.

Bringt man zur Prüfung auf ihre antagonistischen Wirkungen verschiedene Bakterienarten in Bouillon zusammen, so darf man nicht ausser Acht lassen, dass gerade flüssige Nährmedien ein geeignetes Substrat sind, in welchem schneller proliferierende Arten die langsamer wachsenden überwuchern und verdrängen und dadurch bei der quantitativen Bestimmung ein absolutes Zurückbleiben im Wachstum vortäuschen können, während es sich nur um ein relatives handelt. Es kommt hinzu, dass nicht alle Bakterien in gleicher Weise auf geringfügige Alteration des Nährsubstrates reagieren. Diese Beobachtung hat sehr früh schon Freudenreich [2]) gemacht; er schreibt:

„D'autre part, nous voyons qu'un certain nombre de microbes sont peu difficiles dans le choix de leur nourriture. Le bacille du charbon surtout, le bacillus pyocyaneus, le micrococcus prodigiosus et, en général, les espèces saprophytes, s'accommodent assez bien de tous les bouillons qu'on leur offre. Par contre, le microbe du choléra des poules, le bacille typhique, celui de la morve, le tetragenus sont plus délicats et resistent moin bien à une altération de leur milieu de culture."

---

[1]) Schultz, Physiologie des Menschen und der Säugetiere. 4. Aufl. 1909.

[2]) Freudenreich, De l'antagonisme des bactéries et de l'immunité qu'il confère aux milieux de culture, Annales de l'Instit. Pasteur 1888, p. 200.

Nun ist von Conradi und Kurpjuweit[1]) anlässlich ihrer Untersuchungen über spontane Wachstumshemmung der Bakterien eine neue Art der Versuchsanordnung mitgeteilt worden, die angeblich doch den Nachweis von Hemmungsstoffen in Bouillonkulturen gestattet und die, ursprünglich zum Nachweis der Selbstvergiftung der Typhusstämme vorgeschlagen, auch analog auf den Antagonismus zu einer fremden Art anwendbar ist. Die Anordnung des Versuches ist folgende:

Von einer frisch geimpften Bouillonkultur werden innerhalb bestimmter Zeitabschnitte (nach 2, 4, 6 usw. Std.) mittels Messpipette bestimmte Mengen der Bouillon in je 10 ccm eines 2%igen, auf 40° C abgekühlten, eben noch flüssigen Nähragars eingetragen und nach sorgfältiger Verteilung der Mischung zu Platten verarbeitet. Die einzelnen Platten bleiben im Dunkeln und in der Kälte so lange aufbewahrt, bis der zeitlich letzte Versuch beendet ist. Jetzt erst findet die gleichzeitige Impfung aller dieser Platten statt, wobei von einer frisch bereiteten Aufschwemmung (eine Normalöse einer 20std. Agarkultur in 10 ccm Bouillon) wiederum eine Öse der fremden Bakterienart auf der Oberfläche der Versuchsplatten ausgestrichen wird.

Gegen diese Versuche sind ausser von Passini[2]), Manteuffel[3]) und Rolly[4]), die lediglich eine Er-

[1]) Conradi und Kurpjuweit, Über spontane Wachstumshemmung der Bakterien infolge Selbstvergiftung. Münch. Med. Wochenschr. 1905, S. 1761.

[2]) Passini, Die bakteriellen Hemmungsstoffe Conradis und ihr Einfluss auf das Wachstum der Anaërobier des Darmes. Wien. klin. Woch. 1906, 24 Mai.

[3]) Manteuffel, Untersuchungen über die „Autotoxine" (Conradi) und ihre Bedeutuug als Ursache der Wachstumshemmung in Bakterienkulturen. Berl. klin. Woch. 1906, S. 313. — Das Problem der Entwickelungshemmung in Bakterienkulturen. Zeitschr. f. Hyg. Bd. 57, S. 337.

[4]) Rolly; Experimentelle Untersuchungen über das biologische Verhalten der Bakterien im Dickdarm. Deutsch. med. Woch. 1906, S. 1733.

schöpfung des Nährbodens für die Wachstumshemmung der zweiten Art verantwortlich machen wollen, auch von Eijkman schwerwiegende Einwände erhoben worden. Eijkman weist darauf hin, dass die neue Methodik, deren sich die Autoren bedienen, doch wieder auf die Verwendung eines Colloidkörpers, des Nähragars, hinausläuft. Indessen ist klar, dass eine gute Verteilung der bakteriellen Stoffwechselprodukte durch diese Methode erzielt wird und besonders nicht nur die aus einem mehrtägigen Bakterienwachstum hervorgegangenen Endprodukte der ruhenden Kultur, sondern an erster Stelle die Zwischenglieder des intermediären Stoffwechsels von Anbeginn des Bakterienlebens an auf entwickelungshemmende Eigenschaften hin mit quantitativer Genauigkeit geprüft werden können.

Legt man aber keinen so grossen Wert darauf, zeitlich genau den Beginn und den Höhepunkt der Bildung schädigender Stoffwechselprodukte zu fixieren, so kann man auf andere Weise ebenfalls zu recht brauchbaren Resultaten gelangen, wenn man nämlich wiederum zum Gelatine-Nährboden zurückkehrt, diesen, mit der einen Art geimpft, für einige Zeit bei Bruttemperatur flüssig hält, wodurch ähnlich wie in der Bouillon eine gleichmässige Verteilung der Stoffwechselprodukte erreicht wird, und ihn dann nach Erstarrung oder Verarbeitung zu Platten mit der zweiten Art beschickt. In dieser Weise gehen Soyka und Bandler[1]) vor; sie erzielen durch wiederholtes, über 30 Tage lang fortgesetztes Erstarrenlassen und Wiederimpfen der Gelatine eine vollständige Erschöpfung der Kulturen. Anders dagegen Sirotinin[2]); er verwendet nicht völlig erschöpfte

[1]) Soyka und Bandler, Die Entwickelung von pathogenen Spaltpilzen unter dem wechselseitigen Einfluss ihrer Zersetzungsprodukte. Fortschr. d. Medizin, Bd. VI, Heft 2.

[2]) Sirotinin, Über die entwickelungshemmenden Stoffwechselprodukte der Bakterien und die sogenannte Retentionshypothese. Zeitschr. f. Hyg. Bd. VI, S. 262.

Kulturen des Ausgangsmaterials, sondern sorgt stets für Ergänzung eines Teiles der verbrauchten Nährstoffe, dadurch, dass er die Gelatinekulturen der ersten Art — je nachdem sie verflüssigt sind oder nicht — zu gleichen Teilen mit Fleischpepton-Gelatine oder -Agar versetzt oder das verflüssigende Ferment durch Kochen zerstört und der Flüssigkeit Pepton, Kochsalz und Gelatine in bestimmten Gewichtsverhältnissen zusetzt. In diesen Nährböden werden Stichkulturen der zweiten Art angelegt, und nun wird das Wachstum derselben mit gleichzeitig angelegten Kontrollkulturen verglichen. Hat die erste Art dem Substrat eine stark saure Reaktion verliehen, durch welche die Entwickelung der zweiten Art verhindert werden könnte, so muss die Säure neutralisiert und die zweite Art nochmals eingeimpft werden.

Auf derartigen Untersuchungen basieren die weiteren Ergebnisse, die Lode[1]) und später auch Eijkman[2]) mitteilen konnten. Bei den Untersuchungen Eijkmans zeigte sich absolute Entwickelungshemmung für den adäquaten Stamm, also im Sinne eines Isantagonismus[3]) schon wenn die geimpfte Gelatine nur 2 Tage lang bei 37° C gehalten wird, ja es genügt schon, geschmolzene, sterile Nährgelatine mit einer frischen, auf Agar gewachsenen Colikultur bis zur leichten Trübung zu vermischen, um einen nach der Erstarrung angelegten Colistrich nicht aufkommen zu lassen. Bei der Prüfung auf Heterantagonismus zeigt sich insofern eine bemerkenswerte Verschiedenheit, als die artfremde Spezies keine

---

[1]) Lode, Experimentelle Untersuchungen über Bakterienantagonismus. Zentralbl. f. Bakteriol. I, Bd. 33, S. 196.

[2]) Eijkman, Über thermolabile Stoffwechselprodukte als Ursache der natürlichen Wachstumshemmung der Mikroorganismen. Zentralbl. f. Bakteriol. I, Bd. 37, S. 436.

[3]) Mit „Isantagonismus“ wird die Wachstumshemmung durch die Stoffwechselprodukte der eigenen Art, mit „Heterantagonismus“ durch die einer fremden Art bezeichnet.

vollständige Hemmung erfährt, sondern noch ein spärliches Wachstum aufweist.

III.

Den bisher beschriebenen Methoden steht nun eine Gruppe von Experimenten ganz anderer Art gegenüber, deren Zweck es ist, zu entscheiden, ob eine Beeinflussung der Bakterienentwickelung ausschliesslich an das Vorhandensein lebendiger Keime geknüpft ist, oder ob auch abgestorbene bzw. abgetötete Kulturen und die von den Bakterien getrennten Stoffwechselprodukte antagonistische Wirkungen haben. Dabei besteht kein prinzipieller Unterschied, ob man für derartige Untersuchungen ein nichthomogenes, die toten Bakterienleiber noch enthaltendes Substrat oder aber einen z. B. durch Filtration gewonnenen homogenen Nährboden verwendet, denn es enthält ja jede Kultur, in der Bakterien gewachsen sind, abgestorbene Bakterienleiber in grosser Menge und ebenso auch ihre Auflösungsprodukte. Viel wichtiger ist, zu beachten, dass, wenn man zu dem Zwecke experimenteller Darstellung den natürlichen Involutions- und Auflösungsprozess künstlich durch verschiedene Methoden zu steigern sucht, dadurch auch die Qualität der Produkte eine verschiedene sein wird und dass bei der Trennung der Substanzen vielleicht manche wirksamen Stoffe zurückgehalten, andere dagegen ungehindert passieren gelassen werden. Leider ist der Einblick in diese Verhältnisse bei der mangelnden chemischen Fassbarkeit der kompliziert gebauten, wohl auch sehr labilen Substanzen recht erschwert.

Man hat, um Bakterien in den verschiedenen Kulturmedien abzutöten, besonders für die Zwecke der Immunitätsforschung eine Menge von Methoden erfunden und erprobt[1]). Das einfachste Mittel ist die Anwendung

[1]) Kraus und Levaditi, Handbuch der Technik und Methodik der Immunitätsforschung 1907, Bd. I, Liefg. 1.

entsprechender Temperaturen, deren Einfluss von Gabritschewsky und Maljutin[1]) in der Weise studiert wird, dass sie eine frisch gezüchtete und dann während einer halben Stunde bei 70° C im Wasserbade sterilisierte Gelatinekultur gleichzeitig mit einem sterilen Gelatineröhrchen mit einer gleichen Quantität einer anderen Bakterienart impfen und in den Brutschrank stellen. Am nächsten und dem darauffolgenden Tage wird die Zahl der Keime in dem Röhrchen bestimmt, dadurch, dass Verdünnungen mittels der graduierten, von Gabritschewsky[2]) beschriebenen Capillarpipette hergestellt, die Kolonien auf Gelatineplatten gezählt und die Zahlen der Kolonien auf 0,1 ccm der Stammflüssigkeit berechnet werden.

Eijkman[3]), der die Gelatinekulturen zum Zwecke der Sterilisierung längere Zeit kochen lässt, bemerkt, dass nach der Erhitzung eine darauf angelegte Strichkultur nicht so stark sich entwickelt, als im Kontrollröhrchen mit frischer, steriler Gelatine. Namentlich ist dies nicht der Fall, wenn es sich um schon ältere Kulturen handelt. Er meint, es seien dabei andere hemmende Faktoren (teilweise Erschöpfung des Nährbodens, thermostabile Stoffwechselprodukte) mit im Spiele, die durch das Erhitzen nicht beseitigt werden.

Allgemein gültige Grundsätze über die Inaktivierungstemperaturen der Bakterien lassen sich nicht aufstellen, da die verschiedenen Stämme untereinander sehr variieren. In der Regel sieht man Temperaturen um 60° bereits

---

[1]) Gabritschewsky und Maljutin, Über die bakterienfeindlichen Eigenschaften des Cholerabacillus. Zentralbl. f. Bakteriol. Bd. 13, S. 780.

[2]) Gabritschewsky, Zur Technik der bakteriologischen Untersuchungen. Zentralbl. f. Bakteriol. Bd. 10, S. 248.

[3]) Eijkman, l. c.

als inaktivierend wirksam an, doch gibt es eine ganze Reihe bakterieller Stoffe, welche, wie z. B. die Endotoxine des Typhusbacillus, ohne Schaden bedeutend höhere Temperaturen, ja sogar Kochhitze vertragen.

Die Anwendung der Hitze lässt aber bei den Versuchen zweifellos auch ganz neue Faktoren in Wirksamkeit treten. Es ist klar, dass ein durch Kochen denaturiertes Bakterieneiweiss andere Wirkungen entfalten wird, als ein natives, unverändertes. Wahrscheinlich werden durch das Kochen und Auslaugen der Bakterienleiber wieder andere, für das Wachstum der Bakterien förderliche Stoffe frei. Zur Entscheidung dieser Frage hat Rolly[1]) den einen Teil einer Bouillon- oder Gelatinekultur auf der Höhe des Wachstums (also etwa 20 Std. alt) durch Berkefeld-Filter filtriert, den andern Teil eine halbe Stunde lang gekocht. Alsdann impft er beide Teile mit ungefähr der gleichen Anzahl Bakterien der früheren Nährlösung. In diesen Versuchen scheint das Abtöten und Auslaugen der Bakterien durch Kochen begünstigend auf den Nährboden einzuwirken, insofern die Bakterien hier eine etwas grössere Vermehrung zeigen als in den Kontrollnährböden, welche nach der Filtration in derselben Weise behandelt worden waren. Wird aber dieser Versuch mit etwa 6 Wochen alten Kulturen, in denen ein nur geringes oder gar kein Wachstum mehr stattfindet, wiederholt, so ist das Resultat ein völlig negatives: die in diesem Stadium durch Kochen ausgelaugten Bakterien haben keinen fördernden Einfluss auf das Bakterienwachstum in diesen Nährlösungen. Es muss mithin aus den Versuchen der Schluss gezogen werden, dass aus jungen, lebenden Bakterienleibern beim Kochen ganz andere und für das

[1]) Rolly, Experimentelle Untersuchungen über das biologische Verhalten der Bakterien im Dickdarm. Deutsch. med. Woch. 1906, S. 1733.

Wachstum der Bakterien förderliche Stoffe frei werden, als aus alten und teilweise schon lange toten Bakterienleibern.

Etwas weniger eingreifend, als die durch Hitze erreichte Abtötung der Bakterien in ihren Kulturen, ist die Aufschliessung der bakteriellen Leibessubstanzen durch mechanische Zertrümmerung der Individuen, analog dem Verfahren, das bekanntlich von Robert Koch[1]) in die Immunisierungstechnik eingeführt ist: die Hülle der Bakterien, die ihnen einen weitgehenden Schutz gewährt und im wesentlichen aus Schleimstoffen und Hemicellulose[2]) besteht, soll zerrissen werden, damit der nachfolgende Auflösungsprozess dadurch vollständiger gemacht wird[3]).

IV.

Zur Entfernung aller korpuskulären Elemente aus dem Nährboden kommen, wenn man von den Ausfällungsmethoden[4]) absieht, die wegen ihrer nicht unbedeutenden

---

[1]) R. Koch, Über neue Tuberkulinpräparate. Deutsch. med. Woch. 1897, S. 209.

[2]) Unter Hemicellulose versteht man Körper mit wechselnder Jodreaktion, die in verdünnten kochenden Säuren (1% HCl) löslich sind, während echte Cellulosen, d. h. Kohlehydrate von der Formel $(C_6H_{10}O_5)_x$ in verdünnten Säuren unlöslich sind und durch Jod und Schwefelsäure oder durch Chlorzinkjod blau oder violett gefärbt werden. Echte Cellulosen sind im Bakterienreich selten.

[3]) Vgl. a. Levy und Pfersdorff, Über die Gewinnung der schwer zugänglichen in der Leibessubstanz enthaltenen Stoffwechselprodukte der Bakterien. Deutsch. med. Woch. 1902, S. 879.

[4]) Techn. bei Lustig und Galeotti, Versuche mit Pestschutzimpfungen bei Tieren. Deutsch. med. Woch. 1897, S. 227 und Schutzimpfungen gegen Beulenpest. Deutsch. med. Woch. 1897, S. 289.

Alteration des Nährbodens für den experimentellen Nachweis eines bestehenden Bakterienantagonismus nicht brauchbar erscheinen, als geeignete Mittel in Betracht: für feste Nährböden das einfache Herausstechen der gewachsenen Kulturen und die Anwendung von permeablen Pergamentscheidewänden, für flüssige Nährböden das Zentrifugieren, Filtrieren und Dialysieren.

Schon Garrè hat die auf einer Agarplatte gewachsenen Kolonien einer Bakterienart nach hinreichender Entwickelung mit sterilem Platinspatel sorgfältig entfernt und auf dem keimfreien Rückstand, der eventuell noch durch Aufkochen sterilisiert wird, eine Wachstumsverzögerung anderer Bakterien gegenüber gleichzeitig angelegten Kontrollkulturen beobachtet. Experimente dieser Art lehnen sich aufs Engste an die unter der ersten Gruppe mitgeteilten Versuche an, wo ja auch die räumlich weit getrennten Arten nur durch ihre allmählich der Umgebung sich mitteilenden Produkte antagonistisch aufeinander wirken; hier nur mit dem Unterschiede, dass die später geimpfte Bakterienart die hemmenden Stoffwechselprodukte schon im Nährboden vorfindet.

Um nun aber die allmähliche Verbreitung der Hemmungsstoffe im Substrat zu zeigen und die Frage zu entscheiden, ob diese permeabel sind oder nicht, hat Lode[1]) eine Petrischale durch eine Pergamentmembran in zwei Hälften geteilt, die Scheidewand mit Eiweiss gedichtet und die so vorbereitete und mit Agar ausgegossene Schale beiderseits in der Nähe des Pergamentdiaphragmas mit den Antagonisten geimpft. Er findet, dass die Hemmungskreise eines grossen, von ihm untersuchten Coccus nicht vor der Dialysiermembran haltmachen, sondern in die andere Schalenhälfte hinein-

[1]) Lode, l. c.

ragen, und er schliesst daraus, dass die antagonistische Substanz zu den kristalloiden und nicht zu den kolloiden Substanzen zu zählen ist.

Wie weit die Diffusion der von den Bakterien gebildeten Stoffe in vollkommen sterile Umgebung vor sich geht, hat Eijkman[1]) in geistvoller Weise dadurch zeigen können, dass er auf eine gleichmässig geimpfte Agarplatte eine zweite möglichst dünne Agarschicht legt, und auf deren steriler oberer Seite neue Strichkulturen aufträgt. Um eine ganz dünne und doch gut zusammenhängende Schicht zu bekommen, verfährt er folgendermassen. Eine sterilisierte Filtrierpapierscheibe, mit einer Anzahl runder Öffnungen von etwa 1 cm Durchmesser versehen, wird in eine Petrischale mit geschmolzenem Agar (in dünner Schicht) gebracht und nach dessen Erstarrung herausgenommen. Beim Herausnehmen bleibt die die Öffnungen ausfüllende Agarschicht darin hängen, die ganze sogenannte „sterile Papieragarplatte" wird auf dicht mit Bakterien durchsetztes Substrat aufgelegt und auf einer der Öffnungen in verschiedenen Zeitintervallen eine Oberflächenkultur angelegt. Sind hemmende Bakterienprodukte diffundiert, so liefert die Impfung kein sichtbares Wachstum mehr. Dass kein komplettes Durchwachsen der Bakterien die Ursache der Hemmung ist, lässt sich dadurch beweisen, dass die abgehobene Oberfläche von der Nähe der Impfstellen steril bleibt. — Man kann auch eine Papieragarplatte von etwa 1 mm Dicke auf der einen Seite über der ganzen Oberfläche mittels eines sterilen Spatels mit einer Bakterienkultur bestreichen, einige Tage später die Platte umkehren und nun an der sterilen Seite auf einer der Öffnungen wiederum oberflächlich impfen.

[1]) Eijkman, Über thermolabile Stoffwechselprodukte als Ursache der natürlichen Wachstumshemmung der Mikroorganismen. Zentralbl. f. Bakteriol. I, Orig. Bd. 37, S. 436.

Neben den Versuchen auf festen Nährböden sind auch Experimente mit homogenen, körperfreien Flüssigkeiten von grosser Bedeutung. Zu deren Herstellung ist das schonendste, aber auch unsicherste Mittel das Zentrifugieren der Kulturen. Wohl niemals wird es gelingen, mit der Zentrifuge alle toten oder gar lebenden Keime aus der Kulturflüssigkeit auszuschleudern. Setzt man aber der Flüssigkeit fein verteilte Substanzen (sterilisierte Schlemmkreide) zu, durch die die Bakterien mit zu Boden gerissen und abgesetzt werden sollen, so kommt damit das Zentrifugieren im wesentlichen auf ein Filtrieren heraus. Das Filtrieren ist ein ausgezeichnetes Mittel zur Entfernung körperlicher Teilchen, aber eine viel eingreifendere Methode als das Zentrifugieren wegen der Adhäsions- und Adsorptionserscheinungen, die gerade bei eiweissartigen und eiweisshaltigen Substanzen eine so grosse Rolle spielen [1]). Freilich kann man auch durch das Filtrieren noch kein ganz einwandfrei homogenes Substrat erzielen. Nicolle [2]) hat in den Annales de l'Institut Pasteur zuerst die Hypothese aufgestellt, dass die Geisseln der Bakterien wahrscheinlich in die filtrierten Kulturen übergehen können, und de' Rossi [3]) konnte mit seiner Färbemethode in der Tat beweisen, dass die Geisseln durch Berkefeld V sehr leicht filtrieren. Doch die Filtrate sind vollkommen steril, wie man sich leicht über-

---

[1]) Vgl. Gengou, Contribution à l'étude de l'adhésion moléculaire et de son intervention dans divers phénomènes biologiques. Zentralbl. f. Bakteriol. Ref., Bd. 43, S. 401.

[2]) Nicolle, Suite d'expériences relatives au phénomène de l'agglutination des microbes. Ann. de l'Inst. Pasteur 1904, S. 239.

[3]) Gino de' Rossi, Filtrierbarkeit der Geisseln der Bakterien und ihre Funktion als freie Rezeptoren. Zentralbl. f. Bakteriol. I, Orig. Bd. 37, S. 433.

zeugen kann, und als solche zur Prüfung auf antagonistische Wirkungen sehr geeignet.

Emmerich und Löw[1]) haben in neuerer Zeit die als Pyocyanase bekannten filtrierten Flüssigkeitskulturen des Bacterium pyocyaneum nach ihren bakterientötenden Leistungen und entwickelungshemmenden Eigenschaften hin eingehend studiert. Sie haben sie auch bei beträchtlichen Verdünnungen noch wirksam und von hoher Hitzebeständigkeit gefunden. Nach Versuchen Tavernaris[2]) nimmt dagegen die Aktivität der Bakterienfiltrate durch eine ½ Std. lang fortgesetzte Erhitzung bis zu 100° ab. — Zur Entscheidung der Frage, zu welcher Zeit die bactericiden Substanzen in Bouillon gebildet werden, hat Krencker[3]) eine grosse Reihe von Versuchen mit Kulturen verschieden langer Wachstumsdauer angestellt und die bemerkenswerte Tatsache gefunden, dass die Bactericidie filtrierter Bouillon bei Verwendung von mehrere Wochen alten Kulturen erst ihren Höhepunkt erreicht und vor Ablauf einer gewissen (relativ langen) Zeit überhaupt nicht nachweisbar ist. Die Technik aller dieser Versuche gestaltet sich im wesentlichen folgendermassen: Das auf Bacteri-

---

[1]) Emmerich und Löw, Bakteriolytische Enzyme als Ursache der erworbenen Immunität und die Heilung von Infektionskrankheiten durch dieselben. Zeitschr. f. Hyg. Bd. 31, S. 1.

— Die künstliche Darstellung der immunisierenden Substanzen (Nucleasen-Immunproteidine) und ihre Verwendung zur Therapie der Infektionskrankheiten und zur Schutzimpfung an Stelle des Heilserums. Zeitschr. f. Hyg. Bd. 36, S. 9.

[2]) Tavernari, Die Pyocyanase Emmerichs und Löws bei dem experimentellen Milzbrand. Zentralbl. f. Bakteriol. I, Orig. Bd. 31, S. 786.

[3]) Krencker, Über Bactericidie von Bakterienfiltraten. Inaug.-Dissert. Strassburg 1903.

cidie zu prüfende Filtrat wird mit einer Spur einer dichten Bakterienemulsion beschickt, von dem Gemisch wird alsbald nach der Impfung und nach weiteren verschiedenen Zeiträumen eine abgemessene, stets gleiche Menge entnommen und die Anzahl der darin enthaltenen lebenden Bakterien durch das Plattenverfahren bestimmt. Solche Versuche mit Bouillonfiltraten sind auch von anderen Autoren[1]) unter kleinen Modifikationen der Ausführung angestellt worden. Der Vollständigkeit wegen sei noch erwähnt, dass die wachstumsbeschränkende Wirkung wohl auch in etwas weniger exakter Weise konstatiert wird durch makroskopischen Vergleich zwischen der Dichtigkeit der in Bouillon gewachsenen Kulturen, durch Abschätzen der Bakterienmenge nach Zentrifugieren der Kulturen und durch Bestimmung der gebildeten Säure mittels Titrieren.

Lode[2]) weist darauf hin, dass die Bildung des Hemmungskörpers an die atmosphärische Luft geknüpft ist: die Kulturen müssen daher während des Wachstums öfter geschüttelt werden; er lässt auf eine dicht besäte Platte einige Tropfen des Filtrates fallen und erzielt so trichterförmig in die Tiefe reichende Hemmungskreise.

Man kann die Prüfung der bakterientötenden Wirkung des Filtrates auch in eine Form bringen, die Behring[3]) zur Prüfung von Desinfektionsmitteln angegeben hat. Setzt man nach und nach immer grössere bekannte Mengen des Antisepticums (in diesem Falle des Bouillonfiltrates) einer flüssigen Bakterien-

[1]) Vgl. z. B. Faltin, Studien über Hetero- und Isantagonismus mit besonderer Berücksichtigung der Verhältnisse bei infektiösen Erkrankungen der Harnwege. Zentralbl. f. Bakteriol. I, Orig. Bd. 46, S. 6, S. 109 und S. 222, und Hesse und Niedner, Die quantitative Bestimmung von Bakterien in Flüssigkeiten. Zeitschr. f. Hyg. Bd. 53, S. 259.

[2]) Lode, l. c.

[3]) Cit. n. Lehmann-Neumann, Atlas und Grundriss der Bakteriologie. 4. Aufl. 1907. Teil II, S. 27.

kultur zu und legt nach jedem Zusatze und gutem Umschütteln eine Kultur im hängenden Tropfen an, so kann man nach 24 resp. 48 Std. Aufenthalt derselben im Brutschrank sich mikroskopisch von dem Wachstum in den einzelnen Tropfen überzeugen.

Es liegt nahe, ausser der Prüfung auf Filtrierbarkeit der antagonistischen Stoffe auch ihre Dialysierfähigkeit zu untersuchen. Wichtig ist dabei die Art der Membran. Es kommen hauptsächlich Pergament, Collodium und tierische Membranen, wie z. B. Fischblasen, Blinddärme und Dünndarmschlingen von jungen Tieren in Betracht.

Conradi und Kurpjuweit[1]) füllen sterilisierte Schilfsäckchen mit Bouillon, impfen diese und bringen sie nach sorgfältiger Schliessung der Membranen in Reagensröhrchen mit physiologischer Kochsalzlösung. Nach einiger Zeit kräftiger Entwickelung werden die hemmenden Eigenschaften der Schilfsackkulturen wie der bakterienfreien Aussenflüssigkeit untersucht. Demgegenüber gibt Rolly an, dass es ihm nie geglückt sei, Schilfsäckchen zu erhalten, welche die in ihnen eingeschlossenen Bakterien vollständig zurückhielten, also bakteriendicht waren.

Zur direkten Prüfung des Antagonismus der Bakterien unter natürlichen Verhältnissen haben Runel und Fuller[2]) Säcke aus Celloidin, Pergamentpapier oder Gelose mit typhusbazillenhaltigem Wasser gefüllt und dieselben in den Mendotasee versenkt. Die Bakterien bleiben darin nicht länger als 10 Tage virulent.

Im Experiment wird man von vornherein bei den von den Bakterien produzierten Stoffen, welche hinsicht-

---

[1]) Conradi und Kurpjuweit, l. c.

[2]) Runel und Fuller, The longevity of Bacillus typhosus in natural waters and in sewage. Journ. of inf. Dis. Suppl. 1906, S. 40. — Refer. Zentralbl. f. Bakteriol. I, Bd. 42, S. 136.

lich ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften nach Calcar[1]) gleichsam auf dem Grenzgebiete liegen, d. h. die Mitte halten zwischen Kristalloiden und Colloiden, sehr stark auseinanderlaufende Resultate in Bezug auf ihre Dialysierbarkeit erwarten müssen, und es wird gut sein, in vielen Fällen von einer Scheidung der Stoffe von grösserem und kleinerem Molekularvolumen zu sprechen. Über die Form, unter welcher kolloidale Körper in Flüssigkeiten enthalten sind, berichtet Strada[2]) neuerdings bei Versuchen über die Dialysierbarkeit proteolytischer Fermente durch Collodiumsäckchen.

---

[1]) Calcar, Über Dialyse und einzelne ihrer Anwendungen. Berl. klin. Woch. 1905, S. 1368.

[2]) Strada, Sur la filtration de quelques diastases proteolytiques au travers de membranes en collodion. Annales de l'Institut. Pasteur XXII, 1908, S. 982. — Refer. Zentralbl. f. Bakteriol. I, Bd. 43, S. 413.

Eigene Versuche.

Diese im vorigen Abschnitt besprochenen vier prinzipiell verschiedenen Methoden stehen uns gegenwärtig zur Prüfung auf Bakterienantagonismus zur Verfügung. Mit Hilfe dieser vier Versuchsanordnungen, die ich auch weiterhin in geeigneter Weise zu modifizieren suchte, habe ich speziell den Antagonismus zwischen dem Bacterium fluorescens einerseits und der Typhaceen-Gruppe andererseits studiert.

Ich stelle meine Untersuchungen in der Reihenfolge der geschilderten vier Methoden dar und fasse die Endergebnisse jeder Versuchsreihe jeweils in einem kurzen Schlusssatze zusammen.

I.

Je 1 Öse einer 48 std. Fluorescens- und einer 48 std. Typhusbouillonkultur, beide von annähernd gleichmässiger Trübung, werden in ein Reagensglas mit flüssiger Gelatine gebracht und gut gemischt. Darauf werden nach dem Kochschen Verfahren 5 Verdünnungen hergestellt. In genau der gleichen Weise werden Kontrollplatten hergestellt, die nur mit der einen Art geimpft sind. Die Platten werden bei Zimmertemperatur gehalten. Nach 2 Tagen zeigen sich makroskopisch sichtbare Kolonien. In den ersten Platten jeder Serie stehen die Kolonien so dicht, dass die

Gelatine durch den Fluorescens in toto verflüssigt ist. [In der verflüssigten Gelatine sind noch bis zum 8. Tage lebende, entwickelungsfähige Typhusbazillen nachweisbar; vom 10. Tage ab aber konnte ich nur noch Fluorescensbazillen daraus züchten.] Auf den übrigen Platten stimmen die gewachsenen Kolonien bis zum 3. Tage mit denen der Kontrollplatte an Grösse überein, dann aber bleiben die Typhuskolonien im Wachstum hinter denen ihrer Kontrollplatte deutlich zurück, bis auch hier am 5. Tage eine starke gleichmässige Verflüssigung der Gelatine eintritt.

Analoge Versuche mit anderen zur Typhaceengruppe gehörigen Bakterien ergeben, dass die Erreger des Paratyphus A noch stärker als die Typhusbazillen, das Bacterium coli dagegen nur schwach von dem wachsenden Fluorescens beeinträchtigt werden.

Verwendet man die Fluorescensbazillen in sehr starker (zirka 20facher) Verdünnung des Nährbodens, so ist keinerlei Hemmungswirkung mehr zu konstatieren.

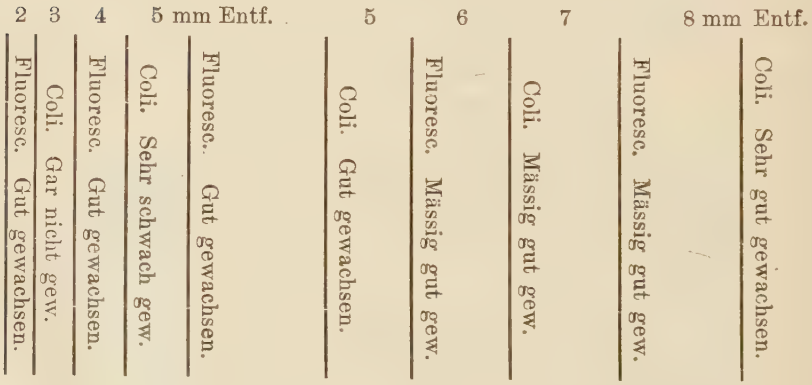
Auf festen Agarplatten werden mit der Platinnadel je 2 Striche alternierend mit frisch gewachsenem Fluorescens- und Typhusmaterial gezogen. Die Entfernung der Striche beträgt 1 bzw. ½ cm; Zimmertemperatur. Bis zum 6. Tage sind beide Fluorescensstriche auf beiden Platten gleichmässig fortschreitend gewachsen; von den Typhusstrichen ist nur jeweils der äussere gewachsen, aber schwächer als auf der Kontrollplatte.

Die Umgebung der Fluorescensstriche fluoresciert bis an die Gegend der Typhusstriche heran. Nach 8 Tagen wird der innere, nicht zur Entwickelung gekom-

mene Typhusstrich nochmals mit frischem Typhusmaterial nachgeimpft, es tritt nach weiteren 2 Tagen nur an den beiden freien Enden des nachgezogenen Striches sehr geringes, zartes Wachstum ein. Die dort entwickelten Typhusbazillen zeigen aber weder in Beweglichkeit, noch Färbbarkeit, noch Gestalt irgendwelche Abweichungen von dem Ausgangsmaterial.

Ähnliche Versuche mit Paratyphus A, B und Coli, die zum Teil auf Glyzerin-, zum Teil auf Zuckeragar ausgeführt werden, ergeben im wesentlichen den gleichen Befund.

Die Abhängigkeit von der örtlichen Entfernung beider Konkurrenten wird durch folgenden Versuch deutlich charakterisiert (Versuchsanordnung von Garrè): Auf einer Agarplatte werden alternierende Striche von 48 std. Fluorescens- und Colikulturen in wachsender Distanz (von 2 bis 8 mm) angelegt und bei Brutschranktemperatur gehalten. Ergebnis nach 2 Tagen:



Auf einer Agarplatte werden 2 rechtwinkelig sich schneidende Striche, der eine von einer 24 std. Typhus-, der andere von einer 8 std. Fluorescens-Agarkultur angelegt und ihr Wachstum bei 37° C beobachtet. Die Impfstriche entwickeln sich gleichmässig gut und entsprechen vollkommen denen der Kontrollplatten.

Wird nun aber der Typhusstrich 24 Std. später als der Fluorescensstrich angelegt, so zeigt sich nach 3 Tagen folgendes Bild: der Fluorescens ist in ganzer Ausdehnung annähernd gleichmässig bis zu einer seitlichen Breite von etwa 6 mm gewachsen; der Typhusstrich dagegen ist nur an den freien Enden kräftig entwickelt, nimmt bis zur Kreuzungsstelle an Breite ab und ist an dieser Stelle selbst fast gar nicht gewachsen. Wird dagegen der Colistrich früher angelegt, so ist eine ähnlich deutliche Beeinflussung der später wachsenden Fluorescensbazillen nicht zu konstatieren.

Ein Versuch, bei welchem Typhus und Fluorescens schachbrettartig in Form von 8 mm entfernt stehenden Punkten auf eine Gelatineplatte geimpft werden (Lewek-Technik), muss nach 3 Tagen wegen zu starker Verflüssigung der Gelatine abgebrochen werden, ehe eine Wachstumsbeeinflussung stattgefunden hat. Daher sind die nächsten Experimente auf Agarplatten ausgeführt.

Coli und Fluorescens werden schachbrettartig in 6 mm Entfernung gleichzeitig geimpft und bei Brutemperatur gehalten. Nach 1 Tag sind die gewachsenen Colikolonien sichtlich etwas kleiner, als die etwa 3 mm grossen der Colikontrollplatte, während die Fluorescenskolonien, zum Teil schon miteinander konfluierend, denen der Kontrollplatte nicht nachstehen.

Am 2. Tage tritt der Grössenunterschied noch deutlicher hervor; eine fluoreszierende Zone reicht bis 9 mm über den besäten Teil der Platte hinaus. Das Bild bleibt in den folgenden Tagen unverändert. Am 10. Tage wird eine der Colikolonien herausgehoben: die Bakterien zeigen in Bouillon noch deutliche, auf schräg erstarrter Gelatine nur geringe Entwickelung; Schwefelwasserstoffbildung und Indolreaktion sehr schwach.

Wird die Impfung mit Coli 36 Std. vor der mit Fluorescens vorgenommen, so wachsen beide Arten kräftig nebeneinander, nur macht sich an den Colikolonien insofern ein Unterschied bemerkbar, als die Randkolonien denen in der Mitte im Wachstum etwas vorausgeeilt sind.

Anders dagegen, wenn die Fluorescenskolonien zuerst und die Colikolonien 24 Std. später angelegt werden: die zwischen den gut entwickelten Fluorescenshöfen verstreuten Coligruppen sind noch nach 6 Tagen kaum über Hirsekorngrösse hinausgegangen; ihre mikroskopische Untersuchung ergibt überwiegend Involutionsformen, die Konturen sind ungleichmässig, die Farbstoffaufnahme ist trotz intensiver Färbung keine gleichmässige.

Alle diese Versuche ergeben, dass bei dem gleichzeitigen Wachstum von Fluorescens- und Typhus-Coli-Bakterien auf festen Nährböden aller Art einseitig antagonistische Wirkungen durch die Stoffwechselprodukte des Fluorescens ausgelöst werden können, die (vorausgesetzt, dass die Kolonien räumlich nicht zu weit voneinander entfernt sind) in dem Einfluss auf die Geschwindigkeit der Entwickelung und die Grösse der Kolonien zum Ausdruck kommen.

II.

In zahlreichen Versuchen wurden Gemische von Fluorescens- und Typhusbakterien in gleicher oder verschieden starker Konzentration über einen längeren Zeitraum in stark verdünnter, schwach alkalischer Bouillon[1]) teils bei Zimmertemperatur, teils im Brutschrank zusammen gezüchtet und von Zeit zu Zeit Proben dieser Mischkulturen untersucht. Das endgültige Ergebnis dieser Untersuchungen ist, dass die Typhusbakterien vom 10. bis 15. Tage an nach den zur Verfügung stehenden Methoden in den Gemischen nicht mehr nachweisbar sind. Doch haben Levy und Gaehtgens[2]), die ähnliche Versuche mit Prodigiosus- und Typhusgemischen anstellten, durch Heranziehung des Tierexperimentes mit Bestimmtheit das Vorhandensein von Typhusbakterien noch nachweisen können, als alle andern Nachweismittel versagten. Der Grund der Beeinflussung ist hier offenbar in der raschen Vermehrung des Fluorescens zu suchen, welche ihn und seine nächsten Verwandten charakterisiert und welche bei beschränkter Nahrungszufuhr (wegen starker Alteration oder Erschöpfung des Nährbodens) eine Schädigung anderer Konkurrenten bedingt[3]).

---

[1]) Nach Empfehlung von Busse (Bakteriologische Mitteilungen, Berichte d. pharm. Gesellsch. S. 290) wird zur Untersuchung für die im Wasser vorkommenden Spaltpilze ein „Bouillonwasser“ von je 2 ccm Fleisch-Pepton-Bouillon und 50 ccm Wasser, in Erlenmeyerkolben nochmals sterilisiert, vorteilhaft angewendet.

[2]) Levy und Gaehtgens, Der Typhusbacillus in Bakteriengemischen, Arbeiten aus dem kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 25, S. 240.

[3]) Vgl. Petruschky, Bakterio-chemische Untersuchungen, Zentralbl. f. Bakteriol. Bd. 7, S. 5.

Ich habe darauf nachzuweisen versucht, ob bestimmte, charakteristische Stammeseigenschaften der Typhus-Coli-Gruppe sich unter dem Einfluss des Fluorescens oder seiner Stoffwechselprodukte ändern. Diese Frage lässt sich leicht entscheiden, da ja bei den Spaltpilzen jede Änderung einer Eigenschaft, welche unter bestimmten äusseren Bedingungen vor sich geht — mag es sich dabei um das morphologische Verhalten, um mechanische oder chemische Leistungen, um Sporenbildung oder Virulenz handeln — hereditär wird, wenn diese äusseren Bedingungen nur lange genug eingewirkt haben. Da bei den Spaltpilzen die Generationen sehr rasch aufeinander folgen, so tritt dieser Vorgang in verhältnismässig kurzer Zeit ein. — Die biologischen Eigenschaften der als Ausgangsmaterial verwendeten Reinkulturen veranschaulicht folgende Tabelle:

Name	Beweglichkeit	Gramfärbbark.	Verfl. der Gelatine	Milch-Koagulat.	Reaktion der Milch	H_2S-Bildung	Indolreaktion	Gasbildung in Zuckeragar
Bact. fluorescens liq.	+	—	+	—	alkal.	—	+schwach	—
Bact. typhi	+	—	—	—	neutr.	+	—	—
Bact. coli	+	—	—	+	sauer	+	+	+

In den 24 Std. alten gleichmässig getrübten Gemischen der Bouillonkulturen findet noch kräftige Schwefelwasserstoffbildung statt, so lange überhaupt noch Typhus- resp. Colibakterien darin nachweisbar sind; dagegen lässt eine in Traubenzuckeragar gebrachte Spur des Fluorescens-Coli-Gemisches jede Gasbildung vermissen und vermag auch Milch nicht mehr zur Gerinnung zu bringen, vielmehr wird diese alsbald unter Gelbgrünfärbung aufgehellt und zeigt alka-

lische Reaktion. Die Fähigkeit der Farbstoffbildung und Verflüssigung der Gelatine seitens der Fluorescensbakterien erleidet keine Einbusse. Beweglichkeit und Färbbarkeit der Individuen bleiben in den Bouillongemischen normal.

Nach der von Conradi und Kurpjuweit angegebenen Methode werden drei Serien von Experimenten angestellt und zwar Serie A mit 2 Std. alten, Serie B mit 8 Std. alten und Serie C mit 24 Std. alten Fluorescens-Bouillonkulturen. Von jeder Serie werden 8 Fluorescens-Agarplatten gegossen und zwar je 4 in einer Verdünnung von 1,0 : 10,0 ccm und je 4 in einer Verdünnung von 0,1 : 10,0 ccm. Die Platten werden dann mit je 1 Platinöse einer frischen Bouillonkultur von Typhus, Paratyphus A, Paratyphus B und Coli bestrichen. Das Resultat ist:

Nach 24 Std.:

Serie A. (Fluorescens 2 Std. alt.)

Grad der Verdünnung der Platte	Wachstum von				Wachstum der Fluorescensbakt. in der Platte
	Typhus	Parat. A	Parat. B	Coli	
Sterile Kontrollplatte	+	+	+	+	—
0,1 : 10,0	+	(+)	+	+	mässig dicht
1,0 : 10,0	(+)	(+)	(+)	+	sehr dicht

Serie B. (Fluorescens 8 Std. alt.)

Grad der Verdünnung der Platte	Wachstum von				Wachstum der Fluorescensbakt. in der Platte
	Typhus	Parat. A	Parat. B	Coli	
Sterile Kontrollplatte	+	+	+	+	—
0,1 : 10,0	(+)	(+)	(+)	+	mässig dicht
1,0 : 10,0	(—)	(—)	(+)	(+)	sehr dicht

Serie C. (Fluorescens 24 Std. alt.)

Grad der Verdünnung der Platte	Wachstum von				Wachstum der Fluorescensbakt. in der Platte
	Typhus	Parat. A	Parat. B	Coli	
Sterile Kontrollplatte	+	+	+	+	—
0,1 : 10,0	((—))	—	—	((—))	mässig dicht
1,0 : 10,0	—	—	((—))	((—))	sehr dicht

Nach 48 Std.:

Serie A. (Fluorescens 2 Std. alt.)

Grad der Verdünnung der Platte	Wachstum von				Wachstum der Fluorescensbakt. in der Platte
	Typhus	Parat. A	Parat. B	Coli	
Sterile Kontrollplatte	+	+	+	+	—
0,1 : 10,0	+	(+)	+	+	mässig dicht
1,0 : 10,0	(+)	(+)	+	+	sehr dicht

Serie B. (Fluorescens 8 Std. alt.)

Grad der Verdünnung der Platte	Wachstum von				Wachstum der Fluorescensbakt. in der Platte
	Typhus	Parat. A	Parat. B	Coli	
Sterile Kontrollplatte	+	+	+	+	—
0,1 : 10,0	(+)	(+)	+	+	mässig dicht
1,0 : 10,0	(+)	(—)	(+)	(+)	sehr dicht

Serie C. (Fluorescens 24 Std. alt.)

Grad der Verdünnung der Platte	Wachstum von				Wachstum der Fluorescensbakt. in der Platte
	Typhus	Parat. A	Parat. B	Coli	
Sterile Kontrollplatte	+	+	+	+	—
0,1 : 10,0	(—)	(—)	((—))	(—)	mässig dicht
1,0 : 10,0	((—))	—	((—))	((—))	sehr dicht.

In den Tabellen bedeutet

+	starkes	Wachstum
(+)	mässiges	„
(—)	geringes	„
((—))	sehr zartes	„
—	gar kein	„

Es zeigt sich also stets eine Wachstumsverzögerung der auf der Oberfläche ausgebreiteten Typhus-Coli-Bakterien,

die bei Verwendung von 2std. Fluorescenskulturen nur angedeutet, bei 8std. aber schon beträchtlich ist und sich bei 24std. zum Teil bis zur völligen Hemmung jeder Entwickelung steigert.

Nach der Versuchsanordnung von Lode wurden Agarplatten dicht mit den Bakterien aus der Typhaceengruppe besät und auf die Oberfläche des Nährsubstrates kleine Mengen einer 24std. Fluorescens-Bouillonkultur gebracht in Form von einigen Impfstrichen oder einzelnen fallenden Tropfen. Die Platten werden dann nach 24- und 48std. Wachstum bei Brutschrank- oder Zimmertemperatur eingehend makroskopisch und mikroskopisch besichtigt. Dabei ergibt die makroskopische Betrachtung im Bereiche des Antagonisten eine bedeutende Abnahme, teilweise sogar ein völliges Fehlen der Typhuskolonien, während sie sich am Rande der Platte in normaler Weise und Menge ausgebildet haben. In Übereinstimmung damit steht das Bild bei schwacher Vergrösserung, welches durch den gleichmässigen dünnen Oberflächenrasen hindurch in der Tiefe nur vereinzelte, kümmerlich entwickelte Typhuskolonien erkennen lässt, die sich erst ausserhalb der Antagonistenzone wieder in normaler Ausbildung und dichter Anordnung finden. Am stärksten ist die Wirkung bei den mit Paratyphus A, am schwächsten bei den mit Coli besäten Platten. — Wird umgekehrt ein frisch erstarrter Fluorescens-Agar-Nährboden mit Typhusbouillon geimpft, so bieten die in der Platte gewachsenen Fluorescenskolonien nichts Abweichendes dar: durch die zarte Schicht der oberflächlich aufgetragenen Bakterien hindurch sind sie in der Tiefe zahlreich, gleichmässig verteilt, gut ausgebildet zu erkennen.

Acht Gelatineröhrchen werden mit je 2 ccm einer dichten, jungen Fluorescensbouillon beschickt und 2 Tage lang im Brutofen flüssig gehalten. Die Gelatine hat nach dieser Zeit ihr Erstarrungsvermögen noch nicht verloren. Vier von den Röhrchen werden jetzt, schräg erstarrt, in Form einer Strichkultur mit Typhus, Paratyphus A, Paratyphus B und Coli geimpft; in den übrigen vier werden Stichkulturen angelegt. Vier sterile Kontrollröhrchen dienen zum Vergleich. Das Wachstumsergebnis nach 24 Std. bei Zimmertemperatur ist:

Wachstum von		Typhus	Paraty. A	Paraty. B	Coli
Strichkultur		sehr gering	gar nicht	gering	gering
Stichkultur		sehr gering	sehr gering	sehr gering	sehr gering
Kontrollröhrchen	Oberfl.	stark	stark	stark	stark
	Stich				

Werden die Gelatineröhrchen nur mit einer geringen Spur Fluorescensmaterial geimpft und nur sehr kurze Zeit im Brutschrank flüssig gehalten, so bleibt die Hemmung des Wachstums aus. Es ergibt sich also, dass sowohl innerhalb der Gelatine, als auch auf deren Oberfläche die Bakterienentwickelung leidet, wenn die lebenden Individuen darin in einem Mengenverhältnis frisch verteilt sind, das eine gewisse Grenze überschreitet.

Versuche, einen Antagonismus im flüssigen Medium (sterilisierten Wasser) unter Heranziehung der von

Beijerinck[1]) eingeführten hochinteressanten „Atmungsfiguren“ nachzuweisen, die es gestatten, die Beziehungen der lebenden Bakterien zum Sauerstoff zu fixieren, führen leider nicht zum Ziel, da die „Bakterienniveaus“, die Stellen der optimalen Ernährungsbedingungen, für die Fluorescensbakterien zwar eine deutliche, scharf umschriebene Schicht darstellen, bei der Typhaceengruppe dagegen in uncharakteristischen, diffusen Trübungen bestehen.

In Bouillonkulturen ist der Nachweis eines Antagonismus zwischen Fluorescens- und Typhus-Coli-Bakterien in einfacher, einwandfreier Weise nicht durchzuführen; dagegen erweist sich ein mit einer genügenden Menge von lebenden Fluorescensbakterien gleichmässig durchsetztes, flüssig gehaltenes kolloides Substrat sogleich nach seiner Erstarrung für die Typhaceengruppe als stark entwickelungshemmend.

III.

Ein erstes orientierendes Experiment ist folgendes: Eine 24 Std. alte Fluorescenskultur in noch unverflüssigter Gelatine wird, zur Hälfte gekocht, zur Hälfte ungekocht, nach der Erstarrung mit Typhus geimpft.

[1]) Literatur bei K. B. Lehmann und Curchod, Beiträge zur Kenntnis der Bakterienniveaus von Beijerinck und der Bakteriengesellschaften von Jegunow, C. f. B. II, Landw. Bd. XIV, p. 449. Vgl. a. Reitz, Chemische Probleme aus dem Gebiete der Bakterien-Forschung. Zeitschr. f. angew. Chemie XXII, S. 105.

Es zeigt sich nach 2 Tagen auf dem gekochten Substrat ein etwas besseres Wachstum der Typhusbazillen als auf dem ungekochten; auf beiden aber bleibt das Wachstum weit hinter dem auf einer sterilen Kontroll-Gelatineröhre zurück.

Weitere Versuche zeigen die Abhängigkeit der Hemmungswirkung von dem Alter der verwendeten Fluorescenskulturen. 3, 2 und 1 Woche alte sowie 4- und 2tägige verflüssigte Gelatinekulturen werden sämtlich ½ Std. lang im Wasserbade bei 100° gehalten, dann mit je 10 ccm Agar gemischt und zu Platten verarbeitet, die darauf mit Coli uud Typhus in Form je eines dünnen Striches geimpft werden. Nirgends zeigt sich absolute Unterdrückung des Wachstums, doch nimmt die Entwickelungshemmung von den jüngsten nach den älteren Kulturen an Intensität fortschreitend zu. Eine Deutung dieser Erscheinung ist auf 2 Arten möglich; entweder bilden die älteren Kulturen hitzebeständigere antagonistische Produkte als die jüngeren, oder es werden beim Kochen aus den jungen Bakterien mehr wachstumsfördernde Stoffe frei, als aus den alten.

Um zu entscheiden, ob auch hier eine elektive Wachstumsbeeinflussung gegenüber den einzelnen Stämmen der Typhaceengruppe zu konstatieren ist, wird das Wachstum von Bact. typhi, paratyphi A, paratyphi B, dysenteriae Typ. I Shiga-Kruse, dysenteriae

Typ. II Flexner, enteritidis Gärtner, typhi murium, alcaligenes und coli auf gekochtem 3 Tage alten Fluorescens-Gelatine-Substrat untersucht. Das Ergebnis ist:

Fluorescens-Gelatine	Wachstum von								
Stichkultur	Typhus	Paraty. A	Paraty. B	Shiga	Flexner	Enteritidis	Typh. mur.	Alcalig.	Coli
Oberfl.	mässig	sehr gering	mässig	mässig	mässig	mässig	gering	mässig	mässig
Stich	gering	sehr gering	gering	gering	gering	gering	sehr gering	gering	gering

Die elektive Wirksamkeit der gekochten Substrate tritt demnach nicht ganz so deutlich hervor, wie die der lebenden Kulturen. Man darf wohl annehmen, dass sie durch die frei werdenden förderlichen Produkte etwas verschleiert wird.

Sehr interessant und instruktiv sind Versuche über die Beziehungen zwischen dem Antagonismus und verschiedener Höhe der längere oder kürzere Zeit einwirkenden Temperatur. Ich habe dazu Temperaturen gewählt von 37 °, d. h. also optimale Wachstumswärme, ferner 55°, die deshalb rationell erscheint, weil, wie wir wissen [1]), auch die Leukocyten nach vorübergehender Erwärmung auf 55° eine Ferment-

[1]) Müller und Jochmann, Über proteolytische Fermentwirkungen der Leukocyten. Münch. med. Woch. 1906, S. 1507.

wirkung entfalten, die ihnen sonst in dem Masse nicht zukommt, 65°, die zur Abtötung der Bakterien gerade notwendige Wärmewirkung, dann 100°, die Kochhitze, und schliesslich 120° unter Druck im Autoklaven. Die Temperaturen kommen je 1/4 und je 3/4 Std. lang auf 3tägige flüssige Gelatinekulturen von Fluorescens zur Einwirkung, die alle noch lebende Bakterien enthalten und bei denen durch Umrühren für eine gleichmässige Wärmeverteilung im Innern gesorgt wird. Die Gelatine wird dann zu gleichen Teilen mit Agar vermischt und zu Platten gegossen. Das Wachstum auf den geimpften Platten nach 2 Tagen bei Zimmertemperatur erläutert folgende Tabelle:

Fluorescens bei		Typhus	Paraty. A	Paraty. B	Coli
37°		kein Wachst.	kein Wachst.	kein Wachst.	kein Wachst.
55°	1/4 Std.	sehr zart	kein Wachst.	zart	zart
	3/4 Std.	sehr zart	sehr zart	kein Wachst.	zart
65°	1/4 Std.	zart	kein Wachst.	—	zart
	3/4 Std.	zart	sehr zart	zart	mässig
100°	1/4 Std.	mässiges Wachstum	mässiges Wachstum	gutes Wachstum	gutes Wachstum
	3/4 Std.	gutes Wachstum	gutes Wachstum	gutes Wachstum	üppiges Wachstum
120°	3/4 Std.	gutes Wachstum	gutes Wachstum	gutes Wachstum	üppiges Wachstum

Beim nachträglichen Aufenthalt im Brutschrank wird das Wachstum der auf den Platten geimpften Bakterien noch deutlicher. Man sieht, wie die lebenden Kulturen einen wesentlich grösseren Wachstumseinfluss ausüben, als die abgetöteten.

Werden junge Bouillonkulturen von Fluorescens durch 1stündiges Kochen im Dampftopf sterilisiert, so tritt bei nachträglicher Impfung der Bouillon mit Typhus oder Coli stets rasch eine Trübung der durch einfaches Filtrieren geklärten Bouillon wieder ein; nur einmal sah ich bei Verwendung einer 10 Tage alten gekochten Fluorescensbouillon die Trübung mehrere Tage lang ausbleiben und konnte im Plattenverfahren von den eingebrachten Typhusbakterien nichts mehr nachweisen.

Zur Untersuchung darüber, ob die mechanisch erschlossene Leibessubstanz der Fluorescensbakterien antagonistische Wirkung hat, werden die von ihrem Nährboden getrennten Bakterien in einer Kugelmühle zerrieben. Da die Fluorescensbakterien in ihrem ausgesprochenen Sauerstoffbedürfnis auf Nährbouillon Häutchen zu bilden pflegen, so habe ich diese sorgfältig abgehoben und auf Fliesspapier getrocknet; ferner werden die auf Nähragar in ziemlich dichter Schicht gewachsenen Bakterien mit sterilem Platinspatel abgestreift und getrocknet; auch durch Zentrifugieren der

Kulturen und Auswaschen des Sediments würde man einwandfreies Material erhalten. Bei der Zertrümmerung der Bakterien in der rotierenden Kugelmühle, die eine Anzahl von Tonkugeln enthält, ist nicht zu vermeiden, dass sich kleinste Teilchen immer wieder von den Kugeln ablösen und niemals ganz entfernt werden können. Nun haben Untersuchungen von Küster[1]) und Levy[2]) die grosse Adsorptionsfähigkeit feinst verteilter Boluspartikelchen für Diphtheriebazillen erwiesen. Doch ist bei der Verarbeitung des zerriebenen Bakterienmaterials zu Platten, wie es zum Zwecke der Untersuchungen ausgeführt wird, dieser Vermischung mit der Tonmasse keine allzu grosse Bedeutung beizulegen, da eine Hemmung des Bakterienwachstums auf sterilen bolushaltigen Nährsubstraten experimentell nicht konstatiert werden kann und zugleich mit den Tonpartikelchen auch die adsorbierten Stoffe in den neuen Nährboden gelangen.

Von dem gewonnenen Bakterienmaterial, das sich bei der Prüfung als steril erweist, wird eine dichte, schwach alkalische Bouillonemulsion hergestellt, zur Hälfte (für ½ Std.) im Autoclaven auf 120° C erhitzt und zu Platten verarbeitet, die mit Typhus, Paratyphus und Coli, sämtlich von frischen, kräftig entwickelten Bouillonkulturen stammend, geimpft werden. Es zeigt sich nach 24stündigem Verweilen der Platten im Brutschrank, dass auf dem auf 120° C erhitzten Substrat kräftiges Wachstum der Bakterien eingetreten ist, das hinter dem auf sterilen Kontrollplatten kaum zurücksteht. Die nicht erhitzten Bakteriensubstanzen haben dagegen das Wachstum des Typhus-Coli-Materials so stark zu beein-

[1]) Küster, Beitrag zur Bolustherapie der Diphtherie. Therapeut. Rundschau 1909, Nr. 14.

[2]) Levy, Die Bolustherapie, ihre Geschichte und Begründung durch Empirie und Experiment. Inaug.-Dissert. Freiburg i. Brg. 1908.

flussen vermocht, dass Paratyphus A überhaupt nicht zur Entwickelung gekommen ist, die übrigen Organismen der Typhaceengruppe nur ein ganz zartes, unter dem Mikroskop eben erkennbares Wachstum aufweisen.

Die Frage, worauf der Antagonismus beruht, den man bei Verwendung zerriebener Bakterien konstatieren kann, wobei also keine ausgeschiedenen Stoffwechselprodukte in Rede stehen, möchte ich hier nur kurz streifen. Man geht wahrscheinlich nicht fehl, wenn man gewisse, durch die Erschliessung der Bakterienleiber frei werdende Nucleoproteide für die antagonistische Wirkung verantwortlich macht. Wenigstens können aus verschiedenen Bakterien, so z. B. aus Typhus- und Diphtheriebakterien, auch aus Pyocyaneus nucleoproteinartige Substanzen isoliert werden, und andererseits ist bekannt, dass die Hefenucleine keimtötende Eigenschaften besitzen und dass darauf vielleicht die Wirkung der zurzeit öfters mit Erfolg in der Therapie Verwendung findenden getrockneten Bierhefe, der sogenannten Levurinose, zurückzuführen ist.

Nicht nur die Stoffwechselprodukte lebender Bakterien, sondern auch abgestorbene und abgetötete Kulturen des Fluorescens wie auch die protoplasmatischen erschlossenen Leibessubstanzen zeigen gegenüber der Typhaceengruppe eine antagonistische Wirkung, die indessen (besonders bei jungen Kulturen) durch gleichzeitig frei werdende wachstumsfördernde Stoffe etwas verdeckt werden kann. Das antagonistische Prinzip ist wenigstens zum Teil thermo- und koktolabil.

IV.

Von einer mit Bact. fluorescens liquef. geimpften Agarplatte werden nach einem 3tägigen, bei 37° C sehr üppig entwickelten Wachstum die Kolonien entfernt, das bakterienfreie Substrat wird auf 100° erhitzt und wiederum zur Platte ausgegossen. Auf dieser weisen von den Stämmen der Typhaceengruppe nur Paratyphus A und Alcaligenes ein deutlich gehemmtes Wachstum auf, Bact. typhi und Bact. enteritidis zeigen eine etwas verzögerte, aber dann doch kräftige Entwickelung, die übrigen gewachsenen Kolonien unterscheiden sich nicht von denen der Kontrollplatten.

Bei der Prüfung auf Dialysierfähigkeit der antagonistischen Stoffe des Bact. fluorescens liquef. durch permeable Pergamentscheidewände in Petrischalen (nach Lode) ergibt sich, dass selbst nach 5tägiger Entwickelung des Fluorescens auf der sterilen Schalenhälfte keine der Typhus-Coli-Arten in ihrem Wachstum gehemmt wird. Das Fluorescensmaterial ist dabei gleichmässig im Nährboden verteilt, während die untersuchten Kulturen in Form von Impfstrichen in der unmittelbaren Nähe des Pergamentdiaphragmas aufgetragen werden.

Eine sterile Papier-Agarplatte (nach Eijkman) wird auf der einen Seite dicht mit Fluorescensbakterien und nach 3 Tagen auf den Öffnungen der anderen Seite mit Typhus- und Colibakterien geimpft; diese letzteren kommen nicht zur Entwickelung. Darauf wird die Platte in einem Petrischälchen ½ Std. lang auf 100° im strömenden Dampf erhitzt und von neuem geimpft: jetzt findet ein sichtbares, aber sehr zartes Wachstum des Colistriches statt.

Experimente mit Bouillonfiltraten.

Verschieden alte Bouillonkulturen von Bact. fluorescens liquefac., die während des Wachstums in Erlenmeyer-Kolben öfter geschüttelt werden, damit die an der Oberfläche gebildeten Häutchen sich auflösen und im Innern keine Verarmung an Sauerstoff eintritt, werden durch sterilisierte Pasteur-Chamberland-Kerzen im Vacuumapparat von Dzierzgowski und Recowski filtriert. In je 4 ccm des sterilen Filtrates, dessen Reaktion alkalisch ist und dessen Farbe je nach dem Alter der Kultur von prächtig grüngelb (fluoreszierend) bis schmutzig braunrot variiert, wird eine Spur einer 24 Std. alten Typhus- resp. Colikultur gebracht, gut gemischt und sofort die Anzahl der in 0,1 ccm enthaltenen Keime mit dem Plattenverfahren bestimmt. Nach 24 Std., während deren die beschickten Filtrate im Brutschrank bei 37° C gehalten werden, wird ebenfalls nach dem Plattenverfahren die Zahl der noch lebensfähigen Bakterien festgestellt. Aus der Relation beider Werte kann man unmittelbar auf die bakterizide Wirkung der Filtrate schliessen.

Prüfung der bakteriziden Wirkung auf Typhusbakterien.

Filtrat einer 6 Tage lang gewachsenen Fluorescenskultur:

Entnahme	Zahl der Kolonien
sofort	196
nach 24 Std.	sehr viele

Prüfung der bakteriziden Wirkung auf Colibakterien.

Filtrat einer 6 Tage lang gewachsenen Fluorescenskultur:

Entnahme	Zahl der Kolonien
sofort	102
nach 24 Std.	sehr viele

Filtrat einer 12tägigen Kultur:

Entnahme	Zahl der Kolonien
sofort	376
nach 24 Std.	0

Filtrat einer 12tägigen Kultur:

Entnahme	Zahl der Kolonien
sofort	60
nach 24 Std.	0

Filtrat einer 16tägigen Kultur:

Entnahme	Zahl der Kolonien
sofort	122
nach 24 Std.	0

Filtrat einer 16tägigen Kultur:

Entnahme	Zahl der Kolonien
sofort	212
nach 24 Std.	0

Filtrat einer 20tägigen Kultur:

Entnahme	Zahl der Kolonien
sofort	407
nach 24 Std.	352

Filtrat einer 20tägigen Kultur:

Entnahme	Zahl der Kolonien
sofort	84
nach 24 Std.	sehr viele

Filtrat einer 25tägigen Kultur:

Entnahme	Zahl der Kolonien
sofort	234
nach 24 Std.	sehr viele

Filtrat einer 25tägigen Kultur:

Entnahme	Zahl der Kolonien
sofort	98
nach 24 Std.	sehr viele

Filtrat einer 3 Monate alten Kultur:	
Entnahme	Zahl der Kolonien
sofort	420
nach 24 Std.	sehr viele

Filtrat einer 3 Monate alten Kultur:	
Entnahme	Zahl der Kolonien
sofort	116
nach 24 Std.	sehr viele

Es geht aus den Versuchen hervor, dass das Filtrat von 12 und 16 Tage lang gewachsenen Kulturen auf Typhus- und Colibakterien abtötende und auflösende Wirkung entfaltet, während bei 20tägigen Kulturen das Wachstum der Typhusbakterien nur eine Hemmung erfährt und 6tägige Kulturen noch nicht, 25tägige nicht mehr bakterizid zu wirken vermögen.

Bei weiteren Versuchen mit dem Filtrat der 16 Tage lang gewachsenen, stark bakterizid wirkenden Fluorescenskultur auf Typhusbakterien ergeben sich folgende interessante Befunde:

1. Das Filtrat wird in einer Verdünnung mit steriler Bouillon im Verhältnis von 1 : 2 unwirksam:

Entnahme	Zahl der Kolonien	
	Verdünn. 1 : 1	Verdünn. 1 : 2
sofort	480	394
nach 24 Std.	0	viele

2. Dreistündiges Erhitzen des Filtrates im Dampftopf hebt seine Bakterizidie auf:

Filtrat	Zahl der Kolonien	
	sofort	nach 24 Std.
unbehandelt	650	0
1 Std. im Dampftopf erh.	364	0
3 Std. im Dampftopf erh.	420	sehr viele

3. Der Einfluss des hellen Tageslichtes (8 Std.) bringt keine Änderung der Wirkung hervor.
4. Im hängenden Tropfen kann man sich überzeugen, dass die Beweglichkeit der Typhusbakterien im Filtrat bereits nach 3 Std. aufgehoben wird.
5. Im Ausstrichpräparat zeigt sich nach 3 Std. verminderte Tingibilität.

Experimente mit Bouillondialysaten.

Zur Herstellung der Dialysate werden kleine Collodiumsäckchen von der Firma Leune, Paris[1]) benutzt, wie sie besonders im Institut Pasteur Verwendung finden. Die bouillonhaltigen, mit Fluorescens geimpften Säckchen werden in Reagensgläser mit steriler Nährbouillon gebracht. Die geimpfte Bouillon wird unter dem Einfluss des Wachstums der Bakterien trüb und bekommt einen Bodensatz, die Aussenflüssigkeit bleibt klar. Diese kann zu verschiedenen Zeiten der Entwickelung entnommen und auf ihre bakteriziden Eigenschaften hin geprüft werden.

Es werden 3 verschieden alte, nämlich nach 1, 2 und 3 Wochen langem Wachstum der Fluorescensbakterien gewonnene Dialysate untersucht. Von diesen ergibt nach 24 std. Beobachtung das erste eine Entwickelungshemmung, die übrigen eine Vernichtung der Typhusbakterien:

Wirkung des Dialysates der 1 Woche lang gewachsenen Kultur.

Entnahme	Zahl der Kolonien
sofort	162
nach 24 Std.	84

[1]) Leune, Paris, Rue du Cardinal-Lemoine 28b.

Wirkung des Dialysates der 2 Wochen lang gewachsenen Kultur.

Entnahme	Zahl der Kolonien
sofort	272
nach 24 Std.	0

Wirkung des Dialysates der 3 Wochen lang gewachsenen Kultur.

Entnahme	Zahl der Kolonien
sofort	228
nach 24 Std.	0

Dass auch der im Collodiumsäckchen enthaltenen Kulturflüssigkeit noch antagonistische Kraft innewohnt, kann man in einfacher Weise zeigen, wenn man eine Spur davon auf eine dicht mit Typhusbakterien durchsetzte Agarplatte bringt: die Kolonien des Typhus kommen im Bereiche des Antagonisten nicht zur Entwickelung.

Das aus früheren Versuchen als stark bakterizid erkannte Filtrat der 16tägigen Fluorescenskultur verliert, wenn es im Dialysiersäckchen in sterile Bouillon gebracht wird, seine bakterizide Wirkung, ohne dass indessen die Aussenflüssigkeit dafür die Bakterizidie annimmt; ob der Grund dafür nur in der damit verbundenen Verdünnung der Substanzen liegt, oder physikalischer Natur ist, mag dabei unentschieden bleiben.

Unter den von den Bakterien isolierten Stoffwechselprodukten des Fluorescens zeigen sowohl die durch Filtration (Pasteur-Chamberland-Filter) als auch durch Dialyse

(Collodiumsäckchen) gewonnenen Substanzen innerhalb gewisser Grenzen für die Typhus-Coli-Gruppe stark antagonistische, bis zur Bakterizidie gesteigerte Wirkung. Das antagonistische Prinzip ist offenbar kein einheitliches (wegen seiner schwankenden Hitzebeständigkeit, seiner nur partiellen Filtrier- und Dialysierbarkeit); es vermag auf kolloidalem Substrat in die sterile Umgebung zu diffundieren, aber permeable Pergamentmembranen nicht zu passieren.

Die gesundheitliche Bedeutung des experimentell erwiesenen Antagonismus unter natürlichen Verhältnissen.

Wenn man auch die experimentell aufs deutlichste erwiesene, stark antagonistische Wirkung des Bacterium fluorescens auf die Typhuserreger nicht ohne weiteres in dem gleichen Masse auf die natürlichen Verhältnisse übertragen darf, so geht man gewiss nicht fehl, wenn man ihr unter den natürlichen Mitteln zur Vernichtung pathogener Keime im Wasser eine grosse Bedeutung beilegt. Wissen wir doch, dass die pathogenen Arten ohnehin im Wasser nur ein kümmerliches Dasein fristen gegenüber den eigentlichen Wasserbakterien[1]). Die

[1]) Lit. b. Tavel, Zur Epidemiologie des Typhus abdominalis. Zentralbl. f. Bakteriol. I, Orig. Bd. 33, S. 166.

Conrádi, Über die Lebensdauer pathogener Bakterien im Wasser. Zentralbl. für Bakteriol. I, Orig. Bd. 36, S. 203.

Massini, Über Typhusbazillen ausserhalb des menschlichen Körpers. Med. Klinik 1909, S. 547.

hygienische Bedeutung speziell des Fluorescens bei seiner Ubiquität ist dabei keine geringe: „Dieser Wasserbewohner, der an sich keine den Menschen schädigenden Eigenschaften trägt, ist also — insofern er ein Gegner krankmachender Spaltpilze ist — als Freund des Menschen zu den nützlichen Spaltpilzen zu rechnen“ (Schottelius)[1]).

[1]) Schottelius, Bakterien, Infektionskrankheiten und deren Bekämpfung. II. Aufl. Stuttgart 1909.

Schlussfolgerungen.

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen fasse ich in folgenden Sätzen zusammen:

1. Zwischen dem Bacterium fluorescens und den Bakterien der Typhaceengruppe besteht ein einseitiger Antagonismus von seiten des Fluorescens.

2. Die Wachstumshemmung tritt am stärksten bei Bacterium paratyphi A und bei Bacterium typhi in die Erscheinung; aber auch gegenüber Paratyphus B und Coli ist das Bacterium fluorescens ein kräftiger Antagonist.

3. Die antagonistischen Wirkungen kommen in erster Linie den Stoffwechselprodukten der lebenden Bakterien zu.

4. Die von den lebenden Bakterien durch Filtration oder Dialyse isolierten Stoffwechselprodukte zeigen innerhalb gewisser Grenzen ebenfalls stark antagonistische, bis zur Bakterizidie gesteigerte Wirkung.

5. Auch abgetötete Bakterien sowie die protoplasmatische erschlossene Leibessubstanz der Bakterien sind antagonistisch wirksam.

6. Das antagonistische Prinzip, das nicht als ein einheitliches aufgefasst werden kann, ist wenigstens zum Teil thermo- und koktolabil; es vermag auf kolloidalem Substrat in die Umgebung zu diffundieren, passiert aber nicht permeable Pergament-Membranen.

Zum Schluss erfülle ich eine angenehme Pflicht, wenn ich mir erlaube, Herrn Geheimen Hofrat Professor Schottelius für die Anregung zu dieser Arbeit und das ihr bewiesene liebenswürdige Interesse meinen ergebensten Dank auszusprechen. Auch sei es mir gestattet, Herrn Privatdozenten Dr. Süpfle für seine jederzeit freundliche Unterstützung verbindlichst zu danken.

Lebenslauf.

Am 2. Oktober 1882 wurde ich, Alfred Welz, zu Lauban in Schlesien als Sohn des Kaufmanns Emil Welz geboren. Nach 4jährigem Besuche der Volksschule absolvierte ich in den Jahren von 1894 bis 1903 das Kgl. Gymnasium meiner Heimatstadt, das ich mit dem Zeugnis der Reife verliess, und widmete mich an den Universitäten in München, Berlin, Kiel, Breslau und Freiburg dem Studium der Medizin. Ende des 5. Semesters bestand ich in Kiel die ärztliche Vorprüfung und nach 10 Semestern in Freiburg das ärztliche Staatsexamen.